Ce rapport exprime les vues collectives d'un groupe international d'experts et ne représente pas nécessairement les décisions ou la politique officiellement adoptées par l'Organisation Mondiale de la Santé.

ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ
SÉRIE DE RAPPORTS TECHNIQUES
N° 64

COMITÉ D'EXPERTS DE LA GRIPPE

Premier rapport

	Pages
1. Introduction	3
2. Groupement des virus de la grippe	5
3. Importance d'une étude suivie des antigènes des virus de la grippe	6
4. Méthodes de comparaison et du typage des souches	7
5. Désignation à donner aux souches de virus de la grippe récemment isolées	7
6. Méthodes de prélèvement et d'expédition des échantillons	8
7. Recommandations concernant des méthodes standards de diagnostic	10
8. Vaccins antigrippaux	11
9. Réunion et diffusion de renseignements épidémiologiques concernant la grippe	14
10. Mesures prophylactiques contre les épidémies graves de grippe	17
11. Traitement de la grippe	18
12. Formation de personnel de laboratoire	19
13. Echange de publications	19
14. Conclusions générales	20
Annexe 1. Méthodes de préparation des antisérums pour la comparaison et le typage des souches de virus de la grippe	22
Annexe 2. Techniques recommandées pour les méthodes standards de diagnostic	26

ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ
PALAIS DES NATIONS
GENÈVE
AVRIL 1953

COMITÉ D'EXPERTS DE LA GRIPPE

Première session

Genève, 8-12 septembre 1952

Membres :

Dr C. H. Andrewes, Centre mondial de la Grippe de l'Organisation Mondiale de la Santé ; Deputy Director, National Institute for Medical Research, Mill Hill, Londres, Royaume-Uni de Grande-Bretagne et d'Irlande du Nord

Professeur I. Archetti, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italie

Dr Dorland J. Davis, Executive Secretary, Influenza Information Center, National Institutes of Health (US Public Health Service), Bethesda, Md., Etats-Unis d'Amérique

Dr M. R. Hilleman, Chief, Diagnostic and Respiratory Research Sections, Department of Virus and Rickettsial Diseases, Army Medical Service Graduate School, Washington, D.C., Etats-Unis d'Amérique

Professeur P. Lépine, Chef du Service des Virus, Institut Pasteur, Paris, France (*Président*)

Professor T. P. Magill, Strain Study Center for the Americas, Department of Microbiology and Immunology, State University Medical Center at New York College of Medicine, Brooklyn, N.Y., Etats-Unis d'Amérique (*Vice-Président*)

Dr Preben von Magnus, Chef de Laboratoire, Statens Seruminstitut, Copenhague, Danemark

Dr J. Mulder, Professeur de Médecine, Clinique médicale de l'Université, Leyde, Pays-Bas

Professor C. H. Stuart-Harris, University Department of Medicine, The Royal Hospital, Sheffield, Royaume-Uni de Grande-Bretagne et d'Irlande du Nord (*Rapporteur*)

Consultant :

Mlle G. Cateigne, Chef de Laboratoire, Centre national de la Grippe, Institut Pasteur, Paris, France

Secrétariat :

Dr Y. M. Biraud, Directeur de la Division des Services d'Epidémiologie et de Statistiques sanitaires, OMS

Dr W. M. Bonne, Directeur de la Division des Services des Maladies transmissibles, OMS

Dr A. M.-M. Payne, Division des Services des Maladies transmissibles, OMS (*Secrétaire*)

Le rapport sur la première session de ce comité a paru primitivement sous forme de document polycopié (WHO/Influenza/16), en date du 10 octobre 1952.

IMPRIMÉ EN SUISSE

Org. mond. Santé : Sér. Rapp. techn. 1953, **64**

COMITÉ D'EXPERTS DE LA GRIPPE

Premier rapport [1]

La Troisième Assemblée Mondiale de la Santé a reconnu l'importance de la grippe et approuvé une proposition demandant qu'un comité d'experts de la grippe soit convoqué par le Directeur général, en 1951.[2] Ce comité n'ayant pu être constitué au cours de la dite année, la réunion a été renvoyée à 1952.

La première session du Comité d'experts de la Grippe s'est tenue à Genève du 8 au 12 septembre 1952. La session a été ouverte par le Dr Brock Chisholm, Directeur général de l'Organisation Mondiale de la Santé. Le Professeur P. Lépine a été élu Président, le Dr T. P. Magill Vice-Président, et le Professeur C. H. Stuart-Harris Rapporteur.

L'ordre du jour provisoire a été adopté.

1. Introduction

La grippe est l'une des maladies infectieuses les plus importantes qui n'aient pu encore être vaincues. Même sous la forme relativement bénigne qu'elle revêt de nos jours, elle est susceptible de causer de lourdes pertes économiques et d'entraîner la désorganisation de services essentiels, d'autant plus que ses effets sont en général concentrés sur une période de quelques semaines seulement. Elle peut aussi être responsable de nombreux décès : c'est ainsi que, en 1949, aux Pays-Bas, 2.200 personnes sont

---

[1] Au cours de sa onzième session, le Conseil Exécutif a adopté la résolution suivante :
Le Conseil Exécutif

1. PREND ACTE du premier rapport du Comité d'experts de la Grippe ;
2. REMERCIE les membres du comité du travail accompli ; et
3. AUTORISE la publication du rapport.

(Résolution EB11.R13, *Actes off. Org. mond. Santé*, **46**, 5)

[2] *Actes off. Org. mond. Santé*, **23**, 47 ; **28**, 43 (Résolution WHA3.71.3.5)

mortes de la grippe et de ses complications en un court laps de temps. Ces faits par eux-mêmes suffiraient à montrer la nécessité de mettre au point la lutte contre cette maladie, mais il est encore plus indispensable de découvrir le moyen de prévenir ou de repousser l'attaque d'une pandémie de grippe mortelle, telle que celle de 1918/19 qui, d'après les estimations, aurait causé la mort d'au moins 15 millions de personnes dans le monde. Nous ignorons pour quelles raisons cette épidémie a éclaté en 1918, et nous ne savons pas davantage si une épidémie similaire ne se produira pas dans l'avenir.

Telles sont quelques-unes des considérations qui ont conduit l'OMS à instituer, en 1947, un programme d'étude de la grippe et de lutte contre cette infection. Le présent comité a passé en revue les travaux effectués au cours des quelques dernières années et a dressé des plans pour renforcer la collaboration internationale dans ce domaine. Cette collaboration s'impose parce que nous connaissons très mal, pour l'instant, les facteurs qui sont à l'origine des épidémies de grippe et qui conditionnent la propagation de la maladie. Or, faute de connaissances précises, il est impossible de la prévenir et de l'enrayer. Un grand nombre, et probablement la majorité des questions à étudier, ressortissent à l'initiative individuelle ou à celle de petits groupes de chercheurs, mais, pour tout ce qui touche à l'épidémiologie de la grippe dans l'ensemble du monde, la collaboration internationale est indispensable car, sans elle, nous ne parviendrions peut-être jamais à obtenir les informations requises.

A divers égards, il convient d'améliorer le système existant. Les renseignements communiqués par les laboratoires déjà bien organisés pourront être mieux interprétés si les chercheurs qui y travaillent utilisent tous les mêmes méthodes, ou du moins des méthodes comparables. Il est, en outre, très désirable d'encourager et de faciliter l'étude de la grippe dans les pays peu évolués. Pour que l'on puisse dresser un tableau épidémiologique complet, il faut que l'on reçoive des renseignements de tous les points du monde.

Le réseau de laboratoires chargés d'étudier la grippe est susceptible de rendre déjà, à plusieurs égards, de grands services aux Etats membres de l'OMS. Cette organisation pourra être à même de les conseiller sur les mesures à prendre, en leur indiquant celles qui sont utiles et celles qui sont inutiles, voire dangereuses. En surveillant de façon constante l'apparition et la propagation de la grippe, il sera plus facile de prévoir avec exactitude les dates et la localisation des épidémies. Les études antigéniques des virus existants devraient permettre de préciser les souches à incorporer dans les vaccins ou de déterminer ceux des vaccins déjà en stock qui pourraient être utilisés. Le comité a examiné en détail les diverses difficultés techniques à résoudre avant que l'on puisse entrevoir une victoire prochaine sur la grippe.

2. Groupement des virus de la grippe

Bien que les souches de virus grippal isolées jusqu'ici présentent une gamme étendue de variantes antigéniques, le comité estime souhaitable, en l'état actuel de nos connaissances, de limiter les subdivisions à des groupes principaux rapportés à des souches particulières. Le nombre de ces groupements pourra être augmenté par la suite, si de nouvelles souches de virus font leur apparition.

C'est en 1938 que, pour la première fois, on a reconnu l'existence de différences antigéniques entre les souches, mais les renseignements concernant les souches antérieures, telles qu'elles se présentaient à l'origine, sont incomplets et l'on manque de preuves suffisantes pour décider s'il y a eu ou non dans le passé une variation continue des souches. Bien que divers laboratoires aient employé des méthodes d'étude différentes et qu'aucun procédé type n'ait encore été universellement adopté pour l'analyse antigénique des souches, on est parvenu à un accord assez général sur la constitution des groupements principaux.

Tout en tenant compte de l'insuffisance des connaissances actuelles sur certains points, le comité recommande la subdivision des virus A de la grippe en trois groupes principaux, dénommés d'après le virus prototype et la date d'isolement de ces derniers :

WS (1933)
PR8 (1934)
FM1 (1947)

Les récentes souches A, dont le type est représenté par les souches FW/1/50 et A/England/1/51, bien que différentes de la souche FM1, ne s'en écartent cependant pas autant que les autres groupes principaux et sont, par conséquent, considérées comme faisant partie du groupe FM1 (1947). Il existe également un groupe hétérogène constitué par les virus de la grippe du porc, qui sont antigéniquement apparentés au virus A de la grippe humaine.

Les virus B de la grippe peuvent être subdivisés en groupes ayant les caractéristiques générales des souches :

Lee (1940)
Bon (1943)

Les souches B les plus récentes (1952) paraissent s'écarter du type Bon et il se peut qu'à la lumière de futures recherches, on soit amené à créer de nouveaux groupes.

Pour le virus C de la grippe, on ne connaît pour l'instant qu'un seul groupe antigénique dont le prototype est représenté par la souche 1233 (1947).

3. Importance d'une étude suivie des antigènes des virus de la grippe

Il convient de procéder à une étude suivie de la constitution antigénique des souches du virus de la grippe qui pourront être isolées dans l'avenir, surtout en raison de l'apparition possible de souches susceptibles de présenter une importance épidémiologique. On ne sait rien du type de virus responsable de la pandémie de grippe de 1918, mais le retour de pareille explosion épidémique reste toujours dans le domaine des possibilités. Une telle éventualité pourrait être associée à une nouvelle variante antigénique, dont il serait alors essentiel de déceler l'apparition au plus tôt.

Il semble qu'il n'existe pas dans la nature de souches stables de virus de la grippe et l'on ignore le mécanisme suivant lequel de nouvelles variantes font leur apparition. L'une des raisons de cette instabilité pourrait être le fait qu'au cours des périodes épidémiques ou interépidémiques, le virus est soumis à un processus de sélection biologique par suite de sa survivance sur des hôtes possédant des degrés variés d'immunité.

Le mécanisme de la propagation de la grippe pourrait être éclairci par la poursuite des recherches récentes sur la répartition géographique des souches du virus grippal. Ces recherches ont montré que deux processus pourraient se trouver à l'origine des épidémies : certaines études suggèrent une propagation d'un pays à l'autre, mais d'autres auteurs penchent pour un passage des virus de l'état endémique à l'état épidémique. De futures études devraient comprendre des recherches collectives comportant la comparaison de souches isolées dans les deux Amériques avec celles qui ont été recueillies en Europe et ailleurs.

L'étude des variantes antigéniques trouve une justification supplémentaire dans la signification profonde que ces variantes comportent dans leur rapport avec l'immunisation artificielle (voir section 8, page 11).

Rien ne prouve que la grippe du porc présente actuellement une relation épidémiologique avec la maladie humaine. Il est néanmoins souhaitable de poursuivre l'étude des virus en cause, car certaines observations précédentes laissent supposer qu'une relation de cet ordre pourrait exister.

4. Méthodes de comparaison et de typage des souches

Le comité est d'avis que l'épreuve d'inhibition de l'hémagglutination [3] est la technique de choix pour la comparaison et le typage des souches. Cependant, il y a divergence d'opinion au sujet des antisérums à utiliser pour cette épreuve. On peut avoir recours à deux catégories d'antisérums : ceux qui résultent d'une infection, par exemple chez le furet, le hamster ou la souris inoculés par voie intranasale, et ceux qui résultent d'une immunisation artificielle, par exemple chez le cobaye, le lapin ou le coq inoculés par voie parentérale. Il est reconnu que les inconvénients principaux de l'emploi du furet sont, d'une part, la nécessité de maintenir l'animal infecté dans un état de strict isolement et, d'autre part, la quantité relativement faible de sérum obtenue. Cependant, l'utilisation d'antisérums de furet a permis de découvrir, entre les souches de virus, des différences qui n'apparaissent pas lorsqu'on se sert d'antisérums de lapin ou de coq. Quelques chercheurs préfèrent néanmoins se servir d'antisérums de coq ou de lapin en raison de la facilité de manipulation de ces animaux et de la plus grande quantité de sérum recueillie. Il convient cependant de souligner que tous les types d'antisérums permettent une bonne différenciation des principaux groupes antigéniques jusqu'ici reconnus, à condition que l'on élimine les inhibiteurs non spécifiques présents dans ces sérums.

On trouvera dans l'Annexe 1 (page 22) une description des méthodes de préparation des antisérums de furet, de lapin et de coq, qui ont donné satisfaction pour l'exécution de ces épreuves, ainsi qu'un exposé des méthodes d'élimination des inhibiteurs non spécifiques.

Il importe que le typage des souches soit exécuté à partir des premiers passages du virus sur l'œuf avant que les caractéristiques de la souche aient été modifiées par la culture sur ce milieu artificiel. A cet effet, ce sont les souches récemment isolées qu'il y a lieu d'adresser aux laboratoires de référence de Londres et de New-York.

5. Désignation à donner aux souches de virus de la grippe récemment isolées

La désignation des souches infectantes au moyen du nom des malades est un système de plus en plus incommode, qui constitue une source possible de confusion. Il est donc indispensable que tous les laboratoires adoptent à l'avenir un système type pour la désignation des souches nouvellement

---

[3] On trouvera une description de l'épreuve d'inhibition de l'hémagglutination utilisée pour la comparaison ou le typage des souches de virus de la grippe dans : Isaacs, A., Gledhill, A. W. & Andrewes, C. H. (1952) *Bull. Org. mond. Santé*, **6**, 287.

isolées. Le comité recommande la méthode ci-après exposée, qui a été employée dans quelques centres au cours des trois dernières années.

La souche isolée, qu'elle soit ou non immunologiquement identique à des souches d'autre provenance, devrait recevoir une désignation composée des éléments suivants :

1) La lettre A, B ou C, selon le groupe auquel elle appartient ;

2) Le nom du pays dans lequel elle a été isolée ou celui de l'Etat, dans le cas d'une fédération, ou encore celui de la ville, s'il s'agit d'une grande ville ;

3) Un numéro de série permettant de différencier la souche de toutes autres souches isolées dans le même lieu ;

4) L'année au cours de laquelle la souche a été isolée.

Une nouvelle souche pourrait donc être désignée par le symbole A/England/1/53.

En ce qui concerne le numéro de série, il importerait qu'il ne puisse être employé pour deux souches différentes, par exemple par deux laboratoires situés dans la même ville. Il est donc recommandé que les numéros de série soient pris sur une liste de chiffres attribués, sur demande, aux divers laboratoires par les laboratoires de référence de Londres et de New-York. Chaque numéro ne devrait être employé qu'une fois, quel que soit le type du virus (A, B ou C). Tout laboratoire devrait épuiser la liste de numéros qui lui seraient attribués, avant de demander une nouvelle attribution, même s'il lui fallait attendre plus d'un an.

6. Méthodes de prélèvement et d'expédition des échantillons

D'une manière générale, il y a lieu de considérer le prélèvement et l'envoi de trois sortes d'échantillons : 1) les souches de virus déjà isolées par un laboratoire ; 2) les lavages de gorge, expectorations, etc., fraîchement recueillis en vue de la recherche du virus ; et 3) les échantillons de sérums prélevés aux fins de diagnostic.

Il est souvent difficile d'entreprendre l'isolement de virus dans des pays dépourvus d'installations de laboratoire adéquates. Ce fait est regrettable, car l'isolement des souches de virus fournit sur la propagation de la maladie des renseignements que ne peut donner l'examen des sérums humains. Néanmoins, les méthodes sérologiques utilisant le sérum des malades sont une source d'information utile pour le diagnostic et l'épidémiologie.

6.1 *Souches de virus grippal*

Les souches qui devront être envoyées à distance aux laboratoires de référence seront, si possible, lyophilisées. En cas d'impossibilité, le matériel sera emballé dans un récipient renfermant une quantité de glace carbonique suffisante pour la durée du voyage.[1] A défaut de glace carbonique, on pourra se servir de glace ordinaire dans une bouteille thermos, mais pour de courts voyages seulement (36 heures, par exemple).

6.2. *Lavages de gorge et autre matériel*

Le matériel recueilli en vue de l'isolement du virus ne sera envoyé à un laboratoire que si l'on est en mesure de le placer dans un récipient garni de glace ordinaire ou de glace carbonique en quantité suffisante pour la durée du voyage. S'il est impossible de recourir à une autre méthode, les échantillons pourront être envoyés par la poste ordinaire, sans être réfrigérés, mais après adjonction d'un égal volume de glycérine neutre. Les prélèvements seront effectués dans les plus brefs délais après le début de la maladie (et en tout état de cause, avant le cinquième jour). Le malade se gargarisera avec 15 ml d'eau, de soluté physiologique, de bouillon bactériologique ou de lait écrémé. Lorsque le lavage sera fait avec de l'eau ou du soluté physiologique, on ajoutera 5 ml de bouillon bactériologique immédiatement après le gargarisme et ce matériel sera placé le plus rapidement possible au froid.

6.3 *Sérums*

Le diagnostic de grippe A, B ou C ne peut d'ordinaire être posé que par l'examen de deux échantillons provenant du même malade, le premier prélevé dans le plus bref délai après le début de la maladie (et, de toute façon, avant le cinquième jour), le second prélevé 10 à 14 jours après le début de la maladie. Le titre des anticorps grippaux dans le sérum humain est si variable que le diagnostic ne peut être posé que par la démonstration d'une élévation significative (d'au moins 1 à 4) du titre de ces anticorps au cours de la maladie, d'où la nécessité de deux échantillons. Pour chacun des sérums, la quantité à adresser au laboratoire est de 2 ml au minimum

---

[1] Pour le transport des échantillons renfermant des virus, il existe de nombreux modèles de récipients isolants, tels que ceux qui sont constitués de bouteilles thermos, de feuilles d'aluminium et de fibre pressée.

La méthode la plus simple, telle que l'emballage dans de la glace carbonique entre des couches de papier journal froissé, a, dans certains cas, donné satisfaction, alors que les bouteilles isolantes sont coûteuses et se brisent fréquemment. Les envois arrivent également brisés dans certains cas, quand la quantité de glace ordinaire ou de glace carbonique est insuffisante et que l'emballage n'est pas assez élastique pour compenser la liquéfaction ou l'évaporation. Des recherches seront encore nécessaires avant que l'on puisse recommander l'adoption généralisée d'un récipient type.

et de 5 ml de préférence, le sérum étant séparé du caillot avant l'envoi. On peut expédier le sang total, si la durée du voyage est inférieure à deux jours. Il faut éviter soigneusement la contamination du matériel pendant le prélèvement de sang, de même que lors de la séparation ultérieure du sérum.

Les échantillons de sérum peuvent être examinés soit par la méthode de déviation du complément, soit par celle de l'inhibition de l'hémagglutination. En vue du diagnostic de la grippe A ou B, la méthode de déviation du complément sera préférée pour les raisons exposées plus loin (voir section 7 ci-dessous).

7. Recommandations concernant des méthodes standards de diagnostic

7.1 *Méthodes sérologiques standards*

On dispose maintenant de méthodes sérologiques standards pour le diagnostic de la grippe et les techniques recommandées pour deux d'entre elles sont exposées en détail dans l'Annexe 2 (voir page 26). Ces techniques, décrites pour l'information des chercheurs non familiarisés avec leur emploi, sont basées sur des méthodes qui se sont montrées satisfaisantes entre les mains de chercheurs expérimentés.

Du point de vue du diagnostic clinique, il suffit de déterminer le type du virus infectant. Les antigènes dits solubles (A ou B) utilisés pour la réaction de déviation du complément telle qu'elle est exposée, permettront de distinguer les infections dues au virus A de celles dues au virus B, tout en éliminant les difficultés qu'entraîne l'existence de variantes à l'intérieur des groupes A et B. En outre, l'anticorps produit contre ce type d'antigène persiste moins longtemps que les anticorps de l'inhibition de l'hémagglutination. En cas de pneumonie grippale, au cours de laquelle l'infection à virus précède parfois de plusieurs jours les complications bactériennes, le titre en anticorps peut déjà avoir atteint un niveau élevé au moment où le malade est admis à l'hôpital. Contrairement à ce que l'on observe avec la méthode d'inhibition de l'hémagglutination, les résultats de l'épreuve ne sont pas modifiés par la présence, dans le sérum, de substances non spécifiques qui produisent des effets analogues à ceux de l'anticorps spécifique. C'est ainsi que, dans la réaction de déviation du complément effectuée avec l'antigène soluble sur le sérum d'un malade atteint de grippe, le premier échantillon de sérum (échantillon de la phase aiguë) ne renferme que de faibles quantités d'anticorps ou ne renferme pas d'anticorps décelable. L'échantillon prélevé pendant la convalescence donnera une bonne réaction de déviation du complément.

L'épreuve d'inhibition de l'hémagglutination est relativement plus spécifique que celle de déviation du complément en ce sens que, pendant la convalescence, on peut voir apparaître dans le sérum des anticorps que seul permet de déceler un antigène préparé à partir de souches apparentées à la souche en cause. Il est donc indispensable d'employer plusieurs types d'antigène ou, à défaut, la souche de virus infectante elle-même si elle est connue. L'épreuve d'inhibition de l'hémagglutination est d'autre part influencée par des inhibiteurs non spécifiques présents dans les sérums. L'échantillon de sérum prélevé à la phase aiguë manifestera donc un certain degré d'inhibition à l'égard du virus antigène, à moins que l'on élimine les inhibiteurs comme on l'a déjà indiqué à propos des sérums d'animaux. Néanmoins, même si les inhibiteurs ne sont pas détruits, le sérum de convalescent, à cause de sa teneur accrue en anticorps, produira une inhibition plus importante contre le virus correspondant.

7.2 *Réactifs standards*

Le comité a examiné dans quelle mesure il serait nécessaire de distribuer des réactifs standards pour les épreuves de diagnostic. Il recommande que l'OMS étudie s'il serait souhaitable de mettre de tels réactifs à la disposition des laboratoires et recherche les moyens appropriés à cet effet.

8. Vaccins antigrippaux

Les résultats obtenus dans le passé ont montré qu'il est possible de réduire la fréquence de la grippe par la vaccination. Néanmoins, le comité pense que l'immunisation par les virus grippaux en est encore au stade expérimental et que les succès, comme les échecs, sont déterminés par divers facteurs dont l'étude doit être poursuivie.

8.1 *Choix de la souche*

Il est démontré que l'antigène employé doit avoir une certaine parenté avec le type de virus contre lequel on recherche la protection. En pratique, ce but peut être atteint soit par l'emploi d'un vaccin mixte renfermant tous les antigènes connus, soit par l'emploi d'une ou deux souches responsables des épidémies les plus récentes. Dans un cas comme dans l'autre, on court le risque que les épidémies à venir se trouvent être causées par une variante antigénique non représentée dans le vaccin. Les vaccins mixtes renfermant tous les antigènes connus présentent le double inconvénient du volume et de la dilution du constituant qui peut être le plus important. Dans tous les cas, le pouvoir antigénique de la souche doit être considéré

en fonction de son aptitude à provoquer la formation d'anticorps. En conséquence, le comité estime impossible, à l'heure présente, de recommander le choix de souches particulières en vue de leur incorporation au vaccin, mais il souhaite qu'une collaboration internationale s'institue pour la sélection des souches vaccinales. Dans l'état actuel de nos connaissances, certains auteurs préconisent l'emploi d'un vaccin monovalent, tandis que d'autres auteurs sont d'avis d'inclure à la fois les virus A et B. On n'a pas entrepris jusqu'ici d'essais d'immunisation avec le virus C de la grippe, en raison de difficultés techniques de sa culture et par suite de l'ignorance où l'on est de son importance en tant qu'agent infectant.

8.2 *Composition des vaccins*

Tous les essais récents ont comporté l'emploi de virus inactivés obtenus par culture sur l'œuf. Le vaccin est ordinairement mis en suspension dans du soluté physiologique ou dans une solution tampon, mais une émulsion dans l'huile minérale (vaccin avec adjuvants) vient de faire son apparition. Au sujet des vaccins qui renferment des substances adjuvantes, on a affirmé qu'ils permettent d'obtenir une quantité plus élevée d'anticorps persistant plus longtemps et qu'ils sont efficaces vis-à-vis d'une plus grande variété d'antigènes que les vaccins préparés dans du soluté physiologique. Bien que ces observations soient encourageantes, il est nécessaire d'effectuer de nouvelles recherches avant de recommander l'emploi courant de vaccins avec adjuvants. En outre, l'innocuité de ces vaccins appelle encore quelques réserves, tandis que celle des vaccins en suspension dans du soluté physiologique ou dans une solution tampon est depuis longtemps démontrée.

Néanmoins, un des principaux avantages des vaccins avec adjuvants pourrait être leur aptitude à provoquer l'immunité à partir de très petites quantités de virus-antigènes. Cette caractéristique pourrait être d'une importance capitale pour la production rapide de vaccins en cas d'épidémie de grippe à forme très virulente.

8.3 *Mode d'emploi*

8.3.1 *Voie d'inoculation.* Les vaccins en suspension dans du soluté physiologique ou dans une solution tampon peuvent être injectés soit par voie sous-cutanée, soit par voie intradermique. L'avantage de ce dernier mode d'administration réside dans l'injection de doses plus petites et dans la diminution du risque de réactions fébriles. Toutefois, on manque encore de données suffisantes sur l'efficacité relative des doses appropriées de vaccin administrées par ces deux voies, en fonction de la production des anticorps.

8.3.2 *Moment de l'injection.* Il est établi que la protection maximum conférée par l'injection de vaccins en suspension dans du soluté physio-

logique ou dans une solution tampon est généralement limitée à une période de deux à six semaines après l'injection. Ce fait devrait être pris en considération par les autorités envisageant un programme de vaccination.

8.3.3 *Risques de réaction.* On a observé des réactions locales et des réactions fébriles, particulièrement à la suite de l'emploi de vaccins exagérément concentrés ou insuffisamment purifiés. Moyennant que l'on prenne les précautions nécessaires, leur fréquence devrait être négligeable. Les doses administrées aux enfants doivent être diminuées en fonction de l'âge et du poids corporel. A tous les âges, il faut éviter d'injecter le vaccin aux sujets sensibilisés à l'œuf.

Il n'existe aucune preuve permettant d'affirmer qu'une poliomyélite paralytique ait pu directement résulter d'une vaccination contre la grippe. Néanmoins, la possibilité de ce risque doit être prise en considération et le comité recommande que, toutes les fois que cela sera possible, la vaccination antigrippale soit exécutée en dehors des périodes où sévit la poliomyélite.

8.4 *Epreuves d'activité*

Un certain nombre d'épreuves pour uniformiser l'activité des vaccins antigrippaux ont été utilisées. Il convient à ce titre de citer en premier lieu une épreuve de protection de la souris au moyen de mélanges de sérums provenant de groupes de souris immunisées avec différentes dilutions du vaccin. Cette épreuve, exécutée par les National Institutes of Health (US Public Health Service), Bethesda, Md., Etats-Unis d'Amérique, exige, pour la neutralisation par le mélange des sérums de souris, l'emploi d'une souche de virus adaptée à la souris. Elle présente d'autres inconvénients, tels ceux qui résultent des variations biologiques individuelles dans la réponse immunologique des différentes souris.

Une deuxième épreuve est celle de neutralisation dans l'œuf par des sérums de souris immunisées. Dans cette épreuve, on peut employer des virus non adaptés à la souris pour mesurer le pouvoir de neutralisation des sérums, ce qui constitue un grand avantage quand les vaccins doivent être préparés à partir de souches récemment isolées.

Une troisième méthode comporte l'immunisation de groupes de volontaires humains et l'essai ultérieur de leur sérum par divers procédés. D'autre part, le comité a appris que des expériences étaient en cours en vue d'adapter aux vaccins antigrippaux certaines méthodes employées pour l'uniformisation des vaccins bactériens. D'autres chercheurs s'efforcent de mettre au point une épreuve analogue à celles dont on se sert pour la standardisation biologique de certains médicaments. Le comité considère que le manque de méthodes standards d'examen des vaccins antigrippaux constitue un obstacle sérieux à leur comparaison. Il recommande, par conséquent, que

l'on procède à la comparaison des diverses méthodes au fur et à mesure qu'elles sont élaborées.

8.5 *Méthodes de production*

Ces méthodes concernent essentiellement les fabricants et, au stade actuel des essais, on ne saurait formuler de recommandations. Toutefois, le comité insiste pour que l'on s'efforce d'assurer au produit final la plus grande pureté possible.

8.6 *Programme d'essais d'application et appréciation de leurs résultats*

Le comité a examiné la question des programmes d'essais pratiques de vaccination antigrippale et les méthodes à appliquer pour en apprécier les résultats. Il désire souligner l'importance qu'il y a à choisir convenablement les groupes témoins et les grandes difficultés que l'on rencontre pour tirer la conclusion de ces essais. A l'heure actuelle, seule l'apparition d'une épidémie causée par un agent infectant d'une virulence relativement uniforme permettrait de porter un jugement définitif sur la valeur de la vaccination. L'existence d'autres maladies de l'appareil respiratoire qui ne sont pas dues au virus de la grippe fausse considérablement l'appréciation des résultats de la vaccination sur des bases purement cliniques dès que ces maladies prennent une certaine extension. De même, les appréciations fondées uniquement sur l'emploi de méthodes sérologiques de diagnostic présentent des inconvénients tels que le manque d'uniformité des réponses individuelles à l'antigène et le fait que la réaction peut ne pas déceler tous les cas de grippe, ce qui risque de faire pencher la balance en faveur de la vaccination.

Le comité a appris que des essais d'application pratique sont entrepris sur une large échelle aux Etats-Unis d'Amérique et dans le Royaume-Uni et que leurs résultats seront évalués sur la base du diagnostic clinique, avec ou sans l'aide d'épreuves sérologiques.

9. Réunion et diffusion de renseignements épidémiologiques concernant la grippe [5]

Comme on l'a signalé plus haut, le virus de la grippe n'a dans la nature aucune stabilité et, à l'heure actuelle, il est impossible de prévoir à quel moment une épidémie grave peut survenir. Si une épidémie de ce genre

[5] On est prié de se référer à la résolution suivante, adoptée par le Conseil Exécutif lors de sa troisième session :

« Le Conseil a écouté avec intérêt l'exposé ... sur les travaux du Centre mondial de la Grippe, de l'OMS ... pendant la récente épidémie de grippe qui a sévi dans certains pays d'Europe. [*Voir suite page 15*].

venait à se produire, elle se propagerait avec une telle rapidité que l'on disposerait de très peu de temps pour organiser la lutte. Le comité insiste donc sur la nécessité qu'il y a pour les administrations nationales à être rapidement informées de toute poussée grippale qui se manifesterait soit sur leur territoire, soit sur les territoires voisins ou dans d'autres régions avec lesquelles leur pays entretient des contacts fréquents. Ceci est indispensable pour qu'elles-mêmes et d'autres autorités nationales aient le temps de prendre des mesures pratiques en vue de faire face à la situation critique créée par une épidémie. Il faut également connaître le plus tôt possible la souche de virus responsable, de manière à pouvoir protéger des groupes choisis de la collectivité au moyen des vaccins spécifiques.

Le comité reconnaît que la méthode habituelle, qui consiste à déclarer les cas individuels et convient parfaitement pour des maladies telles que la fièvre typhoïde, ne saurait suffire lorsqu'il s'agit de la grippe, car nombreux sont les cas non notifiés du fait qu'ils échappent à l'attention des médecins ou que ceux-ci ont trop de travail pour les déclarer individuellement. Le comité souligne également que, dans de nombreux pays, la grippe n'est pas soumise à déclaration et que, dans d'autres, seules les épidémies doivent être déclarées, alors qu'ailleurs chaque cas individuel doit être signalé. Les chiffres indiqués comme correspondant au nombre de cas n'ont donc pas grande signification et il est impossible de comparer les données communiquées par des pays différents. Ce qu'il importe d'établir est un procédé permettant de déceler rapidement une fréquence excessive des cas de grippe (ou de maladies apparentées) et de suivre l'évolution de l'épidémie avec le minimum de retard. On pourrait y parvenir, dans une région donnée, en instituant à l'avance une méthode de calcul qui permettrait d'évaluer l'incidence de la maladie, d'après des renseignements susceptibles d'être obtenus rapidement sur place, tels que l'absentéisme journalier dans un ou plusieurs établissements industriels ou parmi le personnel des services de transports publics, l'absentéisme scolaire, le nombre des demandes de prestations d'assurance dans les pays où les assurances sociales s'étendent à l'ensemble de la population, le nombre des demandes d'admission à l'hôpital (en particulier pour pneumonie), etc. Dans quelques pays, on a récemment introduit un système, qui se révélera peut-être très utile,

---

» Le Conseil a fait remarquer que les administrations sanitaires nationales devraient être informées plus rapidement et plus en détail, non seulement des types de virus en cause, mais aussi de l'évolution épidémiologique, des formes cliniques de la maladie, des taux de morbidité et de mortalité, avec indication des groupes d'âge spécialement touchés, et de toutes mesures administratives reconnues utiles. Il a été décidé que les administrations sanitaires nationales ... seraient invitées à communiquer ces renseignements à l'OMS à Genève pour diffusion. »

(*Actes off. Org. mond. Santé*, **17**, 15, section 5.3.1)

selon lequel un certain nombre de praticiens acceptent de signaler à l'autorité locale de santé le nombre des maladies de type grippal qu'ils traitent quotidiennement. Il appartient naturellement aux autorités nationales de santé de réunir sans délai toutes les informations pertinentes de certaines villes ou régions importantes par leur situation. Ces informations devraient être notifiées rapidement (par télégramme en périodes d'épidémie) aux services épidémiologiques de l'OMS, et celle-ci, à son tour, les ferait connaître aux autres administrations sanitaires par l'intermédiaire de ses bulletins épidémiologiques radiodiffusés chaque jour et au moyen des diverses publications hebdomadaires qu'elle fait paraître et expédie par avion de Genève, de Washington, d'Alexandrie et de Singapour. Ces informations seraient également communiquées par l'OMS à son réseau de laboratoires de la grippe pour que les mesures nécessaires soient prises pour isoler et identifier les virus responsables. Les résultats de ces recherches seraient portés le plus tôt possible à la connaissance des administrations sanitaires nationales par les services épidémiologiques de l'OMS.

Le comité estime souhaitable de rappeler brièvement à ce propos quelques-unes des dispositions du programme de l'OMS contre la grippe.

L'OMS reçoit des renseignements épidémiologiques complémentaires de son réseau de laboratoires spécialisés. Ces renseignements, qui peuvent se rapporter aussi bien à la fréquence de la maladie qu'aux résultats des travaux de laboratoire (réactions sérologiques et isolement des virus), parviennent (au besoin par télégramme) à la fois aux services épidémiologiques de l'OMS et au laboratoire de référence de Londres. L'OMS diffuse ces renseignements de la même façon que ceux qu'elle reçoit des administrations sanitaires nationales. Pour la Région des Amériques, on a estimé indispensable de prévoir des arrangements spéciaux. Les données provenant des Etats-Unis d'Amérique et du Canada sont d'abord rassemblées par le centre compétent d'informations sur la grippe, puis transmis simultanément au Bureau régional de l'OMS (Bureau Sanitaire Panaméricain), au laboratoire de référence de New-York et au siège de l'OMS à Genève. Quant aux renseignements provenant des autres pays de la Région des Amériques, ils sont communiqués simultanément au Bureau régional de l'OMS, au Siège de l'OMS et au laboratoire de référence de New-York. Le laboratoire de référence de Londres est tenu au courant des faits nouveaux par le laboratoire de référence de New-York, aussi bien que par les centres d'informations sur la grippe et par le Siège de l'OMS. De plus, les souches de virus nouvellement isolées sont rapidement échangées entre les deux laboratoires de référence, de manière que l'on puisse dresser un tableau complet de l'épidémiologie mondiale.

10. Mesures prophylactiques contre les épidémies graves de grippe

10.1 *Mesures générales*

Les mesures que l'on a employées dans le passé pour combattre des épidémies de grippe particulièrement graves reposent avant tout sur les méthodes classiques de santé publique. Elles comprennent la quarantaine (voir ci-dessous), la limitation des mouvements des particuliers, l'interdiction des rassemblements (cinémas, réunions publiques, etc.) et, ce qui est plus important, le renforcement des services hospitaliers. D'autres mesures, telles que le port de masques ou la ventilation et la désinfection de l'air (aérosols et lumière ultraviolette) dans certains immeubles, ont une valeur plus douteuse. Il faut évidemment calmer le plus possible les craintes de la population, notamment dans les pays atteints par l'épidémie. En ce qui concerne la quarantaine, le comité estime que l'isolement de groupes à l'intérieur d'une collectivité s'est montré incapable de limiter la propagation de l'infection. A l'échelon national, la quarantaine ne serait vraisemblablement efficace que dans les îles et les communautés géographiquement isolées. Dans le cas de vastes pays ou de continents, ses effets ne peuvent pas être appréciés tant que le mode de propagation de la grippe sera mal connu. Rien ne prouve toutefois que des mesures de quarantaine pourraient être appliquées efficacement dans le cas d'aussi vastes régions. Les remarques qui précèdent permettent de se faire une idée de la valeur probable des restrictions imposées aux voyages de pays à pays : dans le cas d'épidémies de grippe de faible gravité, en particulier, ces restrictions sont totalement injustifiées.

10.2 *Rôle des vaccins*

Le comité fonde beaucoup d'espoir sur l'emploi des vaccins au cours des épidémies, mais le rythme de production des vaccins représente un facteur qui limite leur application. Les laboratoires pharmaceutiques sont peu disposés à préparer et à stocker de grandes quantités de vaccins, qui, de toute façon, risquent de ne pas renfermer les composants antigéniques appropriés. Il est clair toutefois que, si une grave épidémie mondiale survenait, on serait dans l'impossibilité de préparer des vaccins par culture sur l'œuf en quantité suffisante pour répondre à tous les besoins. Les personnes occupant des fonctions essentielles dans la vie sociale pourraient cependant être immunisées ; on pourrait d'autre part réaliser une économie de vaccins en recourant à des injections intradermiques ou en employant des adjuvants. L'emploi éventuel d'un vaccin à base de virus vivants non atténués, soit administré seul, soit associé à l'injection simultanée d'anticorps, ne saurait être recommandé lors des épidémies courantes, mais

pourrait être pratique dans le cas d'une grave manifestation épidémique de grippe. Quoi qu'il en soit, les épidémies virulentes, comme la pandémie de 1918, ont affecté tout particulièrement certains groupes d'âge, que l'on pourrait sélectionner pour les protéger en pareil cas. Le comité recommande à l'OMS de faire une enquête sur le potentiel actuel de production des vaccins antigrippaux.

10.3 *Rôle des antibiotiques*

Pour traiter les complications bactériennes inévitables au cours d'une grave épidémie de grippe, on aurait besoin de quantités très élevées d'antibiotiques. Les stocks actuels se montreraient probablement insuffisants, et les gouvernements risqueraient de limiter leurs exportations. Il faut envisager le cas où une extension rapide des laboratoires pharmaceutiques producteurs d'antibiotiques se révélerait nécessaire. D'après l'expérience actuellement acquise, les antibiotiques les plus utiles seraient d'abord la pénicilline et, en second lieu, ceux qui dérivent d'espèces de *Streptomyces*, notamment l'auréomycine, l'oxytétracycline [6] et le chloramphénicol. L'efficacité possible des sulfamides est plus difficile à estimer, mais il ne faudrait pas la négliger.

Il convient d'insister, en fin de compte, sur le fait que la mortalité, au cours des épidémies de grippe, dépend probablement, en partie, du caractère du virus. Il est donc impossible de dire exactement les résultats que l'on pourrait attendre de l'emploi d'agents antibactériens au cours d'une pandémie virulente.

11. Traitement de la grippe

A l'heure actuelle, il n'existe pas de traitement spécifique des infections causées par le virus de la grippe. Au cours des récentes épidémies, la mortalité a surtout été fonction des complications bactériennes, mais il y a une lacune entre les connaissances théoriques sur la nature et le traitement des complications, d'une part, et le traitement pratique des malades individuels dans leurs foyers, d'autre part. On peut, à cet égard, citer l'exemple de certaines régions où l'on recourt, généralement, aux sulfamides pour traiter, en milieu familial, les pneumonies grippales graves. Ceci peut

---

[6] Oxytétracycline est la dénomination commune internationale de « Terramycine » (voir *Chron. Org. mond. Santé*, 1953, **7**, 42).

retarder indûment l'institution du traitement antibiotique nécessaire en pareil cas. Il ressort clairement de l'expérience récente que les infections bactériennes particulièrement redoutables sont celles causées par le staphylocoque. Contrairement aux infections pneumococciques qui répondent d'habitude favorablement à la pénicilline, la pneumonie staphylococcique consécutive à une infection due au virus grippal réagit parfois assez mal à la pénicilline et à d'autres antibiotiques. Il est donc essentiel d'avoir recours à de fortes doses de pénicilline répétées à intervalles rapprochés et le traitement doit débuter à un stade très précoce de la maladie. La médecine n'a pas encore une expérience suffisante des autres antibiotiques tels que l'auréomycine, l'oxytétracycline et le chloramphénicol pour qu'on puisse déterminer leur efficacité par rapport à celle de la pénicilline mais, dans le cas d'infections dues à des germes pénicillino-résistants, l'un ou l'autre de ces antibiotiques devrait naturellement être employé. Le comité considère qu'il faudrait réunir, sur la nature des espèces de bactéries intervenant dans la pneumonie grippale de nouvelles données provenant du plus grand nombre de pays possible.

Le comité estimerait très utile que l'OMS fît paraître un certain nombre de publications éducatives traitant du diagnostic et du traitement des complications de la grippe.

12. Formation de personnel de laboratoire

Les laboratoires de référence qui font partie du réseau constitué par l'OMS ne peuvent former qu'une personne par an, ce qui, de toute évidence, est insuffisant, d'autant plus que certains pays manquent totalement de virologistes compétents pour l'étude des virus de la grippe. Le comité recommande donc que l'OMS recherche si l'on ne pourrait pas augmenter les possibilités de formation, compte tenu du fait que, pour être de quelque utilité, les stages ne doivent pas être inférieurs à un an.

13. Échange de publications

Le comité estime que les publications faites par les personnalités inscrites au tableau d'experts et par les laboratoires du réseau de l'OMS devraient être librement distribuées à l'intérieur du réseau, de façon à faciliter au maximum l'échange de renseignements dans les moindres délais. Il fait toutefois remarquer qu'il faudrait environ 80 à 100 exemplaires de chaque publication et que le laboratoire d'où celle-ci émanerait ne serait peut-être pas en mesure d'en supporter les frais.

Le comité suggère également qu'une liste de publications récentes soit adressée à date fixe par l'OMS à tous les spécialistes inscrits au tableau d'experts et à tous les laboratoires du réseau de l'OMS.

14. Conclusions générales

Les effets des variations antigéniques des virus grippaux sur l'apparition des cas de grippe clinique dans une population partiellement immune, d'une part, et sur l'efficacité du vaccin, d'autre part, ont été clairement démontrés. Les recherches effectuées au cours des dernières années ont conduit à la mise au point de méthodes satisfaisantes pour l'analyse antigénique rapide des agents infectants et on estime que l'on peut maintenant se préoccuper surtout d'appliquer ces connaissances de base à l'étude épidémiologique de la maladie. Il conviendrait également d'élucider les facteurs qui, indépendamment de la composition antigénique du virus, peuvent présenter une importance pour l'apparition de la maladie chez l'hôte humain. Au tout premier rang se placent les caractères qui provoquent la virulence de la souche responsable et les facteurs non spécifiques susceptibles de conditionner la résistance de l'hôte. Le rôle possible d'un inhibiteur non spécifique limitant la diffusion du virus dans l'appareil respiratoire et le rôle de la flore bactérienne dans l'accroissement de la virulence du parasite ou dans la réduction de la résistance de l'hôte méritent, à cet égard, d'être pris en considération. De tels facteurs peuvent avoir des effets particuliers sur l'apparition de la forme pandémique de la maladie.

De l'avis du comité, le meilleur moyen de prévenir la grippe est, à l'heure actuelle, la vaccination prophylactique et l'on ne saurait fonder beaucoup d'espoir sur les méthodes de quarantaine, excepté peut-être dans le cas de régions lointaines et isolées. Les méthodes de préparation du vaccin en sont encore au stade des essais et de nouvelles recherches seront nécessaires pour que l'on puisse déterminer les souches à inclure dans le vaccin, mettre au point des méthodes de production et des épreuves quantitatives d'activité, et préciser le meilleur mode d'administration du vaccin à l'homme. Le comité fonde de grands espoirs sur l'emploi d'adjuvants pour augmenter la réponse antigénique aux souches contenues dans le vaccin et pour étendre la durée de l'immunité. De toute évidence, les quantités de vaccin disponibles limiteront considérablement le nombre des personnes susceptibles d'être immunisées, mais il y a lieu de penser qu'on pourra augmenter ce nombre en réduisant la dose de virus grâce à l'emploi d'adjuvants.

L'épreuve de déviation du complément et l'épreuve d'inhibition de l'hémagglutination peuvent, dès maintenant, faciliter beaucoup le diagnostic de la grippe. Tandis que l'épreuve d'inhibition de l'hémagglutination

présente, du point de vue des recherches, certains avantages sur l'épreuve de déviation du complément, il convient de noter que cette seconde méthode est plus simple et plus indiquée pour les besoins courants.

Des résultats scientifiques importants ont déjà été obtenus dans l'étude de la grippe et on peut raisonnablement en attendre d'autres, grâce aux efforts de chercheurs particuliers ou aux travaux de certaines institutions. Il y a toutefois divers domaines où l'intervention active de l'OMS peut faciliter grandement les progrès.

1) En premier lieu, il faut mentionner la continuation et l'extension du programme de centralisation, de corrélation et de diffusion des renseignements concernant l'apparition de cas de grippe, l'épidémiologie de la maladie et les constatations de laboratoire. Ces renseignements constituent les bases nécessaires à partir desquelles on pourra établir des méthodes de prévention et de lutte valables contre la grippe. Il faut également multiplier et intensifier la diffusion et les échanges d'informations scientifiques entre les chercheurs du monde entier. Il serait peut-être utile, à cet égard, d'envisager l'achat et la distribution de tirés à part d'articles publiés.

2) En deuxième lieu, vient la formation d'un personnel compétent pour recueillir des renseignements essentiels sur l'apparition des souches et pour réunir des données épidémiologiques dans les pays où il n'y a actuellement aucun spécialiste. Il faudrait également prendre des dispositions en vue d'aider le personnel ainsi formé et lui fournir des installations de laboratoire dans les régions où il sera appelé à travailler.

3) En troisième lieu, il conviendrait de prévoir la fourniture de matériel de diagnostic à certains laboratoires désignés qui sont incapables de se le procurer par eux-mêmes. Ce matériel devrait être préparé dans un laboratoire unique (de préférence un laboratoire commercial), et être remis sans frais aux usagers. Il conviendrait aussi d'envisager la fourniture d'antisérums des souches prototypes de base, en vue d'analyses préliminaires rapides des souches nouvellement isolées dans ces laboratoires.

Un article, dont le besoin se fait sentir avec urgence et qu'il faudrait également fournir, est un récipient léger et convenablement isolé pour l'expédition par avion de virus ou de prélèvements cliniques conservés à basse température.

Annexe 1

MÉTHODES DE PRÉPARATION DES ANTISÉRUMS POUR LA COMPARAISON ET LE TYPAGE DES SOUCHES DE VIRUS DE LA GRIPPE

1. Préparation de l'antisérum de furet

Après ponction cardiaque sous anesthésie, deux furets sont inoculés par voie intranasale avec 1 ml de dilution à 10^{-2} de liquide allantoïque infecté fraîchement récolté. Les animaux sont tenus dans un strict isolement et saignés le treizième jour qui suit l'inoculation. Après séparation, on ajoute aux sérums 1/10.000 de merthiolate et on les conserve à 2°C. On peut également les conserver à –70°C ou les lyophiliser.

L'échantillon de sérum prélevé avant l'inoculation de l'animal est traité au moyen d'un filtrat cholérique, puis est soumis à la recherche des anticorps de la grippe de façon que l'on puisse exclure une infection naturelle du furet antérieure à l'inoculation. Le sérum recueilli après l'inoculation ne peut servir pour l'analyse des souches que si le sérum prélevé avant l'infection s'est révélé, à l'épreuve d'inhibition de l'hémagglutination, dépourvu d'activité inhibitrice spécifique.

Certains chercheurs estiment nécessaire le traitement des sérums au moyen d'un filtrat cholérique préparé comme il est indiqué plus loin (page 24). Un volume de sérum, additionné de quatre volumes de filtrat cholérique brut, est mis à l'étuve à 37°C pendant une nuit, puis on chauffe le mélange pendant une heure à 56°C pour détruire l'activité de l'enzyme cholérique. D'autres chercheurs (Burnet & Stone [1]) recommandent le traitement de l'antisérum de furet par l'enzyme cholérique qui détruit le récepteur, cet enzyme étant préparé à partir d'un filtrat cholérique par absorption au moyen d'hématies de poule à 5 % pendant une minute à 2°C, suivie d'une élution en soluté physiologique pendant 30 minutes à 37°C. L'éluat est dilué dans une solution tampon à l'acétate de pH 6,0 et on mesure son aptitude à détruire l'inhibiteur non spécifique sur du sérum de furet normal en employant une technique analogue à celle décrite plus loin. L'éluat est alors employé avec de l'immunsérum de furet à la plus haute dilution efficace. Cette dilution est mélangée au sérum et le tout porté à l'étuve à 37°C pendant une nuit, puis traité par chauffage à 56°C pendant une heure.

[1] Burnet, F. M. & Stone, J. D. (1947) *Aust. J. exp. Biol. med. Sci.* **25**, 227

2. Préparation de l'antisérum de lapin

L'antigène est constitué par du liquide allantoïque infecté prélevé sur des œufs embryonnés. Des œufs de 10 jours sont inoculés dans le sac amniotique avec 0,25 ml d'une dilution à $10^{-\frac{1}{2}}$ d'une semence de virus adaptée à l'œuf et de titre élevé. Les œufs sont incubés pendant trois jours, puis on les refroidit ; on prélève alors le liquide allantoïque et on détermine leur pouvoir d'hémagglutination. Les liquides ayant un titre d'hémagglutination élevé sont réunis et leur stérilité bactérienne est vérifiée. (Aucun antibiotique ni aucune autre substance bactériostatique ne sont employés.)

De jeunes lapins adultes, sains, de l'un ou l'autre sexe, reçoivent à une semaine d'intervalle, par voie intrapéritonéale, trois injections de 5 ml de liquide allantoïque infecté non purifié. Ils sont saignés une semaine après la troisième injection.

Le sérum brut est traité en vue de la recherche des inhibiteurs non spécifiques selon la méthode décrite ci-après.

3. Préparation de l'antisérum de coq

L'antigène provient d'œufs embryonnés préalablement incubés pendant 9 jours à 39°C, qui sont inoculés dans la cavité allantoïque avec 0,4 ml d'une dilution convenable de la semence de virus (habituellement, liquide allantoïque infecté dilué à 10^{-4}). Après inoculation, les œufs subissent une nouvelle incubation à 35°C pendant 40 à 44 heures et les liquides allantoïques sont recueillis après refroidissement des œufs à la glacière. Le titre d'hémagglutination du liquide employé pour l'immunisation doit être au moins de 1/320 (dilution initiale) ; des titres de 1/640 ou 1/1.280 sont préférables.

Après une saignée préliminaire, des coqs pesant 2 à 3 ½ kg reçoivent, par voie intraveineuse, 5 ml de liquide allantoïque infecté et, par voie intrapéritonéale, 10 ml du même liquide. Avec des souches récemment isolées dont le titre d'hémagglutination peut être bas (1/320), il est préférable de répéter les injections le jour suivant.

Dix jours après l'injection initiale, les coqs font l'objet d'une ponction cardiaque (avec des spécimens de grosse taille, on peut prélever 80 ml par jour pendant 3 jours consécutifs). On laisse le sang coaguler et on débite le caillot en petits fragments qu'on laisse pendant une nuit à la glacière, puis à la température du laboratoire pendant 5 à 6 heures (pour favoriser la rétraction du caillot). Le sérum est prélevé, inactivé à 56°C pendant 35 minutes, lyophilisé en ampoules de 0,5 ou 1 ml, puis conservé à +4°C. On peut également congeler le sérum non desséché et le conserver à –20°C.

On détermine par l'épreuve d'inhibition de l'hémagglutination le titre des sérums avant et après l'immunisation. Avec un antigène homologue,

l'immun sérum prélevé doit avoir un titre au moins égal à 1/800 (dilution initiale), bien qu'un titre de 1/400 puisse être acceptable. Le sérum prélevé avant l'immunisation ne doit pas avoir de pouvoir inhibiteur à la dilution de 1/50. La plupart des virus ne sont pas inhibés par le sérum normal de coq dilué à 1/50, mais on peut exceptionnellement observer une inhibition non spécifique pouvant aller jusqu'à 1/200 avec des souches de virus récemment isolées. Pour l'analyse des souches, les sérums doivent être traités en vue d'en éliminer les inhibiteurs non spécifiques ; à cet effet, l'échantillon est mis à l'étuve à 37°C pendant 6 heures avec 4 volumes de filtrat cholérique brut, préparé comme il est indiqué ci-après. L'enzyme cholérique est finalement inactivé par chauffage à 56°C pendant 50 minutes et l'on n'enregistre pas de perte décelable d'anticorps.

Les analyses antigéniques des souches sont faites par la méthode classique d'inhibition de l'hémagglutination, au moyen de globules rouges humains. Il est essentiel, en pareil cas, de lire les résultats après une incubation de durée constante, 55 minutes par exemple.

4. Préparation du filtrat brut de vibrion cholérique pour la destruction des inhibiteurs

Préparation de la culture

La souche de *V. cholerae* 4Z (Burnet Stone) est cultivée dans un milieu nutritif gélosé renfermant 2 % de gélose et 2 % de peptone (pH 7,6), avec repiquage toutes les trois semaines. Comme le pouvoir de production d'enzyme est inconstant et peut décroître dans la série des repiquages, les cultures obtenues par repiquage qui produisent une quantité importante d'enzyme doivent être lyophilisées.

La culture-mère destinée à la préparation d'un filtrat est constituée par une culture de 6 à 8 heures dans un milieu nutritif liquide renfermant 2 % de peptone (pH 6,9). A partir de cette culture, on ensemence des boîtes de gélose contenant 0,8 % de gélose et 2 % de peptone (pH 6,9), que l'on place à l'étuve pendant 16 heures. On doit ainsi obtenir une culture abondante. La surface de la gélose est alors raclée et la récolte filtrée à travers une gaze stérile (8 couches). Le liquide ainsi obtenu est ensuite passé sur un filtre bactériologique en amiante. Le filtrat, dont le pH final ne doit pas dépasser 7,6 est stable pendant longtemps à 2°-4°C, mais il convient, à intervalles fréquents, de vérifier son pouvoir enzymatique comme il est indiqué ci-après. La qualité de la peptone employée dans les milieux est le facteur le plus important pour la préparation d'un filtrat actif. On comparera différentes marques de peptone et celle qui se révélera la meilleure sera desséchée et conservée en récipients scellés sous vide, à 4°C.

Epreuve d'activité

Pour éprouver l'activité du filtrat, on mélange le filtrat avec du sérum normal dans la proportion d'une partie de sérum pour quatre parties de filtrat. On laisse ce mélange pendant la nuit à l'étuve à 37°C, puis on le chauffe pendant une heure à 56°C. Les sérums de furet, de lapin ou de coq conviennent tous à l'épreuve, mais demandent des titrages distincts.

On effectue ensuite, avec le matériel traité, des réactions d'inhibition de l'hémagglutination vis-à-vis de deux souches de virus. Les virus sont sélectionnés de telle sorte que l'un soit adapté à la souris mais conserve sa sensibilité à l'inhibiteur, et que l'autre, également très sensible à l'inhibiteur, appartienne à une souche A du groupe FM1, récemment isolée et cultivée seulement sur œuf.[2]

L'épreuve proprement dite consiste à mélanger un volume du virus d'épreuve renfermant 4 unités d'hémagglutination et deux volumes du mélange filtrat-sérum non dilué. Le tout est placé à 2°-4°C pendant une demi-heure, puis on ajoute un volume de suspension d'hématies de coq dans du soluté physiologique. La dilution finale du sérum dans ce mélange est de 1/10. A cette concentration de sérum, on ne doit observer aucune inhibition de l'hémagglutination avec l'un ou l'autre des virus. Les dilutions du mélange filtrat-sérum sont d'habitude préparées et essayées en même temps pour mettre en évidence l'activité relative des filtrats de faible activité. Le procédé qui consiste à mélanger le virus et le sérum une demi-heure avant l'adjonction des hématies augmente considérablement la sensibilité de l'épreuve.

Du fait que certains échantillons de filtrat cholérique renferment un excès de calcium qui rend thermostable l'enzyme détruisant les récepteurs des hématies, il est nécessaire de procéder à des contrôles convenables pour s'assurer que le chauffage à 56°C a bien inactivé l'enzyme. Dans le cas contraire, le lot doit être rejeté.

---

[2] Les souches de virus qui se sont montrées satisfaisantes dans l'épreuve décrite ci-dessus sont la souche A/Nederland/1941 adaptée à la souris et la souche A-Barrett/England/1947 adaptée à l'œuf.

Annexe 2

TECHNIQUES RECOMMANDÉES POUR LES MÉTHODES STANDARDS DE DIAGNOSTIC

1. Epreuve de déviation du complément

La technique décrite ci-après est fondée sur la méthode recommandée par Hoyle,[1] mais les antigènes sont préparés à partir d'œufs infectés, au lieu de poumons de souris comme dans la méthode originale.

1.1 Réactifs

1.1.1 *Antigènes*

Les antigènes sont préparés selon l'une des deux méthodes suivantes qui, l'une et l'autre, ont donné des résultats satisfaisants dans différents laboratoires.

Les souches PR8 ou WS de virus grippal A et la souche Lee de virus grippal B sont employées pour les deux méthodes.

Méthode A

Après 10 ou 11 jours d'incubation, on inocule des embryons de poulet dans la cavité allantoïque avec 0,1 ml d'une dilution à 10^{-3} ou 10^{-4} de liquide allantoïque infecté. Après une nouvelle incubation de 42 à 48 heures à 35°C, on prélève les membranes que l'on met en suspension dans du soluté physiologique (1 ml par membrane) et que l'on congèle rapidement dans un mélange d'alcool et de glace carbonique ; on les laisse ensuite dégeler lentement à la température du laboratoire. La congélation suivie de décongélation est répétée trois fois, puis la suspension est centrifugée à 3.000 tours par minute pendant 15 minutes. On recueille le liquide surnageant auquel on ajoute 2 % de chloroforme. Après agitation vigoureuse, on laisse reposer à 4°C pendant une nuit. La suspension est alors centrifugée à nouveau et le liquide surnageant est recueilli : ce liquide constitue la source d'antigène soluble. Il peut être conservé à 4°C, mais il est recommandé de le dessécher sous congélation si l'on désire le conserver pendant plus d'un mois.

Méthode B

Semence. On inocule des œufs embryonnés de 9 jours avec 0,4 ml d'une dilution à 10^{-4} de liquide allantoïque infecté par le virus. Après nouvelle

[1] Hoyle, L. (1948) *Mon. Bull. Minist. Lab. Serv.* **5**, 114

incubation à 35°C pendant 40 à 44 heures, les œufs sont refroidis à la glacière et le liquide allantoïque prélevé. Les liquides allantoïques, qui doivent avoir un titre d'hémagglutination de 1/640 à 1/1280, sont soit utilisés immédiatement, soit conservés pour une période indéfinie à –70°C en ampoules de verre scellées, dans une glacière à glace carbonique.

Préparation de l'antigène. On inocule dans la cavité allantoïque des œufs embryonnés de 11 jours avec 0,5 ml du liquide allantoïque non dilué obtenu comme il est indiqué ci-dessus. Après 6 heures d'incubation à 35°C, on ouvre les œufs et on recueille les membranes chorio-allantoïques. Celles-ci sont lavées soigneusement dans trois récipients successifs renfermant du soluté physiologique et sont séchées sur papier buvard et pesées. On les passe alors pendant 3 minutes dans un broyeur du type « Waring » avec un poids égal de soluté physiologique, pour obtenir une suspension à 1/2. On centrifuge alors ce matériel à 3.000 tours par minute pendant 10 minutes pour sédimenter le tissu et on recueille le liquide surnageant. Son infectiosité est détruite par irradiation aux rayons ultraviolets dans des conditions d'exposition minimum qui sont à déterminer pour chaque type de lampe. Des épreuves d'infectiosité sont effectuées sur l'œuf avec l'antigène pur et avec l'antigène dilué à 10^{-1} et 10^{-3} pour éviter les effets d'interférence.

On prépare des antigènes témoins normaux en traitant de la même façon des œufs embryonnés de 11 jours non inoculés.

Ces préparations sont indéfiniment stables lorsqu'elles sont conservées à –20°C ou à 4°C.

1.1.2 *Sérums*

Les sérums sont inactivés à 56°C pendant 30 minutes. S'ils ne sont pas employés immédiatement, ils peuvent être soit conservés à –20°C, soit additionnés de 0,08 % d'azide de sodium et conservés à la température de la glacière (4°C).

1.1.3 *Complément*

On conserve à –70°C un mélange de sérums de cobayes. A cette température, le complément garde longtemps son titre.

En l'absence d'installations appropriées, le complément peut être conservé par la méthode de Richardson [2] (acide borique-sorbitol azide).

Solution A

Acide borique (H_3BO_3)		1,55 g
Chlorure de sodium saturé	q.s.p.	100 ml

[2] Richardson, G. M. (1941) *Lancet*, **2**, 696

Solution B

Sorbitol ($C_6H_{14}O_6$, ½ H_2O)		9,55 g
Azide de sodium (NaN_3)		0,81 g
Chlorure de sodium saturé	q.s.p.	100 ml

Solution C

Azide de sodium		0,81 g
Chlorure de sodium saturé	q.s.p.	100 ml

A chaque fraction de 8 ml de sérum on ajoute 1 ml de solution A et 0,5 ml de chacune des solutions B et C. On conserve à la glacière et, au moment de l'emploi, on dilue à 1/8 avec de l'eau distillée, pour obtenir une dilution de complément à 1/10.

1.1.4 *Diluant*

Les antigènes mentionnés ci-dessus sont dilués par le soluté physiologique, bien que d'autres types d'antigènes préparés à partir d'œufs puissent nécessiter l'emploi d'une solution tampon, comme celle recommandée par Mayer et al.[3]

1.1.5 *Système hémolytique*

On se sert d'une suspension à 2 % d'hématies de mouton lavées et sédimentées, à laquelle on ajoute un volume égal d'une dilution de sérum hémolytique renfermant 10 doses hémolytiques minimums.

1.2 Titrage du complément

On dispose une série de tubes renfermant 0,2 ml de dilution du complément (1/10, 1/15, 1/20, 1/25, 1/30, 1/35, 1/40, 1/50, 1/60, 1/70, 1/80, 1/90, 1/100). On ajoute à chaque tube 0,4 ml de soluté physiologique et 0,4 ml d'hématies sensibilisées. Les tubes sont portés au bain-marie à 37°C pendant 30 minutes ; on note la plus haute dilution donnant une hémolyse totale (100 %), ainsi que la plus haute dilution donnant 50 % d'hémolyse (on reconnaît celle-ci en centrifugeant les hématies et en comparant le liquide surnageant à une dilution à 1/2 d'un tube où l'hémolyse est complète). Pour l'épreuve de déviation du complément, le complément est dilué de façon à contenir, par unité de volume, deux fois et demi la dose hémolysante minima du titre donnant à la lecture une hémolyse totale, ou quatre fois et demi la dose hémolysante minima du titre donnant à la lecture 50 % d'hémolyse. Ces deux façons de procéder correspondent d'ordinaire exactement ; lorsqu'il y a une différence entre elles, le titre

[3] Mayer, M. M., Oslet, A. G., Bier, O. G. & Heidelberger, M. (1946) *J. exp. med*, **84**, 535

obtenu avec la dose donnant une hémolyse à 50 % est celui qui est le plus précis.

Le complément conservé garde son titre inchangé pendant quelques semaines. Lorsqu'il a été titré exactement, il est préférable d'employer la même dilution chaque jour plutôt que de le titrer à nouveau pour chaque épreuve. En d'autres termes, il est préférable d'employer toujours la même quantité de complément et de ne pas tenir compte de variations minimes de la sensibilité du système hémolytique.

1.3 Titrage de l'antigène

Chaque lot d'antigène liquide préparé est titré en présence d'un excès de sérum positif connu. A cet effet, on dispose des séries de tubes renfermant chacun 0,2 ml d'antigène dilué (1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32), 0,2 ml de complément et 0,2 ml de dilution du sérum (par exemple un sérum d'un titre de 1/64 serait employé à la dilution 1/8). Les tubes sont portés au bain-marie à 37°C pendant une heure ; on ajoute dans chacun d'eux 0,4 ml d'hématies sensibilisées, puis les tubes sont à nouveau portés au bain-marie pendant 30 minutes. On laisse déposer les hématies et on fait la lecture. Tout tube présentant une hémolyse inférieure à 50 % est considéré comme positif. Tout tube présentant une hémolyse égale ou supérieure à 50 % est considéré comme négatif.

Cet essai permet de déterminer le titre maximum de l'antigène. La quantité optimum d'antigène à employer dans les titrages de sérum est égale à trois fois le titre maximum mais, en pratique, on emploie quatre fois le titre maximum, car il est préférable d'avoir un léger excès d'antigène plutôt qu'une quantité insuffisante.

1.4 Epreuve standard pour le titrage des anticorps dans le sérum

Chaque tube employé dans cette épreuve renferme 0,2 ml d'antigène, 0,2 ml de complément et 0,2 ml de dilution du sérum.

Pour les sérums normaux, on utilise les dilutions 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, et pour les sérums de convalescent les dilutions 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128 et 1/256.

En outre, on prépare un sérum-témoin avec une dilution de sérum à 1/2, l'antigène étant remplacé par du soluté physiologique.

La durée prévue pour la déviation du complément est d'une heure, les tubes étant mis au bain-marie à 37°C et agités après 30 minutes. Après 1 heure, on ajoute 0,4 ml d'hématies sensibilisées ; on porte encore au bain-marie pendant une demi-heure, puis on laisse déposer les hématies et on fait la lecture.

Les tubes présentant une hémolyse inférieure à 50 % sont considérés comme positifs et ceux qui présentent une hémolyse égale ou supérieure à 50 % sont considérés comme négatifs, sauf dans le cas où la dilution du sérum à 1/2 donne une lecture de 50 % exactement, que l'on considérera comme douteuse.

Par conséquent, les sérums peuvent être considérés comme négatifs, douteux (1/2) ou positifs pour des titres compris entre 1/2 et 1/256.

1.5 Epreuves à volume réduit et micro-réactions

L'épreuve standard exige de grandes quantités d'antigène. Quand on doit procéder à de nombreuses épreuves, il peut être préférable d'employer des volumes réduits de réactifs, selon le schéma suivant:

Epreuve standard		*Epreuve à volume réduit*		*Micro-réaction*	
Antigène	0,2 ml	Antigène	0,1 ml	Antigène	0,05 ml
Complément	0,2 ml	Complément ...	0,1 ml	Complément ..	0,05 ml
Sérum dilué	0,2 ml	Sérum dilué	0,1 ml	Sérum dilué ...	0,05 ml
Hématies sensibilisées	0,4 ml	Hématies sensibilisées	0,2 ml	Hématies sensibilisées	0,1 ml
	1,0 ml		0,5 ml		0,25 ml

Pour la micro-réaction, il est nécessaire d'opérer avec une pipette à volume constant donnant régulièrement 0,05 ml. En procédant soigneusement, la micro-réaction peut être rendue presque aussi précise que l'épreuve standard.

Les épreuves utilisant 0,1 ml de complément et 0,2 ml d'hématies sensibilisées se sont, à l'usage, montrées satisfaisantes et économiques en réactifs : elles peuvent donc être recommandées.

2. Epreuve d'inhibition de l'hémagglutination

2.1 Matériel nécessaire

1. Soluté physiologique (NaCl à 0,85 % dans de l'eau distillée).
2. Citrate de sodium à 2 % (en soluté physiologique).
3. Pipettes sérologiques de 1 ml graduées en 0,01 ml.
4. Tubes de Kahn (12×75 mm) à fond régulièrement hémisphérique et porte-tubes appropriés.
5. Suspension standard d'hématies (voir section 2.2).
6. Antigènes standards (voir section 2.3).
7. Antisérums standards (voir section 2.4).

2.2 Suspension standard d'hématies

La suspension standard doit renfermer 0,5 % d'hématies de poulet dans du soluté physiologique (on peut également, si on le désire, se servir de globules rouges humains du groupe sanguin « O »).

On prélève le sang dans la veine axillaire ou par ponction cardiaque et on y ajoute immédiatement 20 % en volume de citrate de sodium à 2 %. Le sang citraté peut être conservé à 4°C pendant une semaine au maximum.

La suspension standard d'hématies doit être fraîchement préparée chaque jour, de la manière suivante : laver environ 10 ml de sang citraté en trois lavages successifs effectués chaque fois avec environ 50 ml de soluté physiologique. Après le troisième lavage, mettre les hématies en suspension dans environ 10 ml de soluté physiologique et verser dans un tube à centrifuger conique gradué de 15 ml. Placer le tube dans un pot à centrifuger en se servant de l'adaptateur approprié (pot à centrifuger N° 320 et adaptateur N° 312 si on emploie les centrifugeuses de l'« International Equipment Company »).

Centrifuger pendant 10 minutes dans une centrifugeuse horizontale à 3.200 fois la valeur de *g* (accélération terrestre). Mesurer le volume des hématies par lecture directe sur le tube gradué, éliminer le liquide surnageant et suspendre les hématies dans une quantité suffisante de soluté physiologique pour obtenir une suspension à 0,5 % (199 volumes).

2.3 Antigènes standards

A l'heure actuelle, il est recommandé de préparer les antigènes avec les souches PR8 et FM1 de virus grippal A et avec les souches Lee ou Bon de virus grippal B. Chacune de ces souches doit être obtenue à partir d'un lot unique de liquides allantoïques. Les liquides allantoïques ainsi réunis doivent provenir d'œufs inoculés avec un virus choisi à cet effet et être prélevés sur les œufs dont les embryons ne sont pas âgés de plus de 12 jours.

Pour réduire la formation de précipités qui apparaissent à la longue, le lot de liquides allantoïques est dilué à 1/4 dans du soluté physiologique et on ajoute 1/10.000 de merthiolate comme préservatif. Cette dilution au 1/4 renfermant 1/10.000 de merthiolate constitue l'antigène-stock et doit avoir un titre non inférieur à 1/64. On la conservera dans un réfrigérateur à une température voisine de 4°C.

2.3.1 *Unités d'hémagglutination*

L'unité d'hémagglutination correspond à 0,25 ml de la dilution d'antigène-stock la plus élevée qui soit capable d'agglutiner complètement la

suspension standard d'hématies de poulet. Cette unité se calcule comme suit :

1) Prélever 1,0 ml d'antigène-stock dans le flacon et diluer avec 3,0 ml de soluté physiologique. On constitue ainsi la « dilution de travail ».

2) Disposer 2 rangées de tubes de Kahn comprenant chacune 10 tubes. Verser 1,0 ml de soluté physiologique dans chacun des tubes de la première rangée. Procéder alors comme suit à la préparation et à la répartition de matériel dilué à raison 2 :

Avec une pipette de 1 ml, ajouter 1,0 ml de la dilution de travail au premier tube de la première rangée. Rejeter la pipette. Bien mélanger avec une nouvelle pipette et transférer 1,0 ml du mélange dans le second tube de la première rangée et 0,25 ml dans le premier tube de la deuxième rangée. Rejeter la pipette. Avec une nouvelle pipette, mélanger le contenu du deuxième tube de la première rangée et transférer 1,0 ml du mélange dans le troisième tube de la première rangée et 0,25 ml dans le deuxième tube de la deuxième rangée. Procéder de la même façon pour toute la série des tubes jusqu'à ce que chacun des tubes de la deuxième rangée renferme 0,25 ml de la série des dilutions à raison 2. Rejeter la première rangée de tubes.

3) A chaque tube ajouter 0,25 ml de soluté physiologique (pour amener le volume à 0,5 ml).

4) Ajouter à chacun des tubes 0,5 ml de la suspension d'hématies de poulet.

5) Ajouter un tube-témoin renfermant 0,5 ml de solution physiologique et 0,5 ml de suspension d'hématies.

6) Bien mélanger par agitation.

7) Porter à l'étuve à 22°-24°C. Lire les résultats après 60 minutes en observant l'aspect du fond des tubes de Kahn. (Pour les pays chauds où la température du laboratoire dépasse normalement 24°C, il convient d'admettre une autre méthode consistant à placer les tubes à la glacière pendant deux heures (0°-4°C) et à lire les résultats immédiatement à la sortie de la glacière.) La quantité de 0,25 ml de la dilution la plus élevée de la « dilution de travail » qui agglutine complètement la suspension standard d'hématies correspond à une unité (c'est-à-dire renferme une unité d'hémagglutination).

2.3.2 *Antigène d'épreuve.* L'antigène d'épreuve doit contenir 4 unités d'hémagglutination de virus. Pour cela, on dilue la dilution de travail de façon à obtenir une solution d'antigène quatre fois plus concentrée que la dilution qui a donné une hémagglutination complète dans l'épreuve précédente.

Exemple : Si la dilution la plus élevée de la dilution de travail qui a complètement agglutiné la suspension d'hématies était de 1/64 (sixième dilution à raison 2), la dilution de la dilution de travail que l'on désire obtenir sera 64/4, c'est-à-dire qu'elle correspondra à une partie de la dilution de travail pour 15 parties de soluté physiologique.

Pour s'assurer qu'il renferme bien 4 unités d'hémagglutination, il faut essayer l'antigène ainsi préparé (antigène d'épreuve), en procédant de la manière décrite ci-dessus (voir *Unité d'hémagglutination*, paragraphes 2, 3 et 4). Les deux premiers tubes de la série doivent présenter une agglutination complète des hématies et le troisième une agglutination moins complète.

2.4 Antisérums standards

Il faut introduire dans l'épreuve des antisérums ayant un titre inhibiteur connu vis-à-vis de chacun des antigènes d'épreuve.

2.5 Recherche du taux d'anticorps inhibant l'hémagglutination du sérum

Quand l'épreuve est faite aux fins de diagnostic, il est indispensable de réunir les sérums par paire. Pour déterminer le titre en anticorps des sérums de titre inconnu, on compare, dans la même épreuve, les paires de sérums et des antisérums connus, en présence des antigènes standards. La manière de procéder est la suivante :

1) Tous les sérums à essayer doivent être inactivés à 56°C pendant 30 minutes.

2) Pour chaque sérum à essayer, disposer 4 rangées de 10 tubes de Kahn chacune. Ajouter 1,0 ml de soluté physiologique à chacun des tubes de la première rangée. Au premier tube de la première rangée, ajouter 1,0 ml d'une dilution à 1/8 du sérum (soit 0,2 ml de sérum dilué dans 1,4 ml de soluté physiologique). Mélanger soigneusement et transférer 1,0 ml du mélange dans le deuxième tube de la première rangée, en se servant d'une pipette de 1 ml. Bien mélanger et transférer 1,0 ml du mélange dans le troisième tube de la première rangée. Continuer ainsi les dilutions à raison 2 pour tous les tubes de la première rangée. Avec la même pipette, introduire ensuite 0,25 ml de la dixième dilution à raison 2 dans chacun des derniers tubes des trois autres rangées (dixièmes tubes des trois rangées). Transférer alors 0,25 ml de la neuvième dilution dans chacun des tubes correspondants des trois autres rangées (neuvièmes tubes). Continuer de même pour les huitième, septième et autres dilutions jusqu'à ce que tous les tubes aient reçu leur dilution correspondante. Rejeter les tubes de la première rangée, qui ne sont pas utilisés pour l'épreuve finale proprement

dite. Dans le cas où l'on désire employer deux souches de virus grippal B, les volumes indiqués ci-dessus devront être modifiés en conséquence.

3) Préparer des dilutions convenables d'antisérums connus.

4) Après la préparation des dilutions de sérum, ajouter 0,25 ml de chacun des antigènes d'épreuve à chacun des tubes de la rangée appropriée.

5) Ajouter à chacun des tubes contenant le mélange virus-sérum 0,5 ml de la suspension d'hématies à 0,5 %.

6) Agiter soigneusement et examiner les tubes pour vérifier que les hématies sont bien suspendues.

7) Porter à l'étuve à 22°-24°C pendant 60 minutes, puis faire la lecture en examinant l'aspect des hématies déposées au fond des tubes.

Le titre est exprimé par la plus haute dilution initiale de sérum qui provoque une inhibition complète de l'agglutination.

Les antigènes d'épreuve doivent être retitrés au moment où les épreuves d'inhibition de l'agglutination sont pratiquées. A cet effet, on procède de la façon décrite ci-dessus (voir *Unité d'hémagglutination*). Là encore, on doit observer une hémagglutination complète dans les deux premiers tubes de la série de dilutions à raison 2, alors que le troisième tube doit présenter une agglutination moins complète.

Le titrage des virus et des antisérums peut être modifié dans une certaine mesure selon les préférences individuelles. Le changement de pipettes pour chaque dilution, lors de la préparation des dilutions d'antigènes ou d'antisérums en série n'est pas indispensable, à condition que l'on prenne toutes les précautions nécessaires si l'on emploie une seule pipette.

3. Epreuve d'inhibition de l'hémagglutination dans la grippe C

Le diagnostic de la grippe C par inhibition de l'hémagglutination n'a pas donné satisfaction dans tous les laboratoires, principalement à cause de la difficulté rencontrée pour obtenir l'antigène dans la cavité amniotique. L'épreuve a cependant donné de bons résultats dans certains laboratoires qui ont employé la technique décrite ci-après.

Préparation de l'antigène. Le virus grippal C pousse mal dans la cavité allantoïque des œufs embryonnés, mais il peut être obtenu à concentration élevée dans le sac amniotique. On préférera la souche 1233 qui a donné des titres plus élevés que d'autres souches de virus. Dans la cavité amniotique d'œufs embryonnés incubés pendant 10 jours à 39°C, on inocule 0,1 ml d'une dilution à 10^{-2} de la préparation convenable de semence du

virus. Après une nouvelle incubation à 35°C pendant 26 à 30 heures, les œufs sont refroidis à la glacière et leur liquide amniotique recueilli. Le matériel peut être soit employé immédiatement, soit conservé à l'état lyophilisé par fractions de 0,5 ml.

Les antisérums du virus grippal C peuvent être préparés sur le coq selon la technique décrite plus haut dans l'Annexe 1. Toutefois, une injection intraveineuse unique de 2,5 ml, accompagnée d'une seule injection intrapéritonéale de 2,5 ml, suffit en général. On a pu obtenir des titres d'inhibition de l'hémagglutination atteignant 1/25.600. Du fait que tous les sérums essayés à ce jour, qu'il se soit agi de sérums humains et de sérums d'animaux, se sont montrés dépourvus d'inhibiteurs non spécifiques, il n'est pas nécessaire de procéder au traitement par le filtrat de vibrion cholérique.

L'hémagglutination et l'inhibition de l'hémagglutination sont pratiquées suivant une modification de la technique standard décrite dans la présente annexe. En raison de l'élution rapide du virus grippal C des globules rouges à la température du laboratoire, les titrages du sérum et de l'antigène doivent être effectués à froid (4°C). Les titres de virus sont lus après 75 à 90 minutes d'incubation et les résultats des épreuves d'inhibition d'hémagglutination après 60 à 70 minutes. On emploie pour l'épreuve des hématies humaines.

4. Modification de la technique d'inhibition pour permettre l'emploi de plateaux en matière plastique

Pour le titrage des virus et des sérums, on peut se servir de plateaux en matière plastique au lieu de tubes à hémolyse.

Des dilutions successives à raison 2 (0,25 ml [4]) du virus sont préparées dans du soluté physiologique et on ajoute un volume égal d'hématies de coq à 0,5 %. On procède à la lecture en observant la disposition des globules sédimentés et en notant le point terminal de l'hémagglutination partielle (50 %). Le point terminal 50 % est déterminé d'après l'aspect des globules avec une dilution à 1/2 de la dilution de virus qui donne exactement une agglutination complète. Lorsque l'agglutination partielle (50 %) ne se produit dans aucune dilution, le point terminal est déterminé par interpolation.

---

[4] Les volumes indiqués sont ceux qu'il convient d'employer quand on se sert des plateaux distribués par le Centre mondial de la Grippe. L'emploi de plateaux ayant des cavités de dimensions différentes nécessiterait une modification proportionnelle des volumes.

Pour le titrage des anticorps dans le sérum, on prépare des dilutions successives de sérum (0,25 ml) dans du soluté physiologique, et on ajoute dans chaque tube un volume égal d'hématies puis, immédiatement après, le même volume d'antigène. L'antigène est préparé de façon qu'il contienne, par fraction de 0,25 ml, 8 doses de virus donnant une agglutination partielle ; en même temps qu'à l'épreuve d'antihémagglutination, on procède à une épreuve-témoin pour déterminer la concentration du virus réellement présent. On choisira l'agglutination partielle comme point terminal ; à défaut, on déterminera ce point par interpolation.